

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **64-027471**

(43)Date of publication of application : **30.01.1989**

(51)Int.Cl.

C12N 9/10
C12P 21/00
// A23C 19/032
A23J 3/00
A23L 1/03
A23L 1/04
(C12N 9/10
C12R 1:01)

(21)Application number : **62-165067**

(71)Applicant : **AJINOMOTO CO INC
AMANO PHARMACEUT CO LTD**

(22)Date of filing : **01.07.1987**

(72)Inventor : **MOTOKI MASAO
OKIYAMA ATSUSHI
NONAKA MASAHIKO
TANAKA HARUO
UCHIO RYOSUKE
MATSUURA AKIRA
ANDO HIROYASU
UMEDA KOICHI**

(30)Priority

Priority number : **62 49157** Priority date : **04.03.1987** Priority country : **JP**

(54) NOVEL ENZYME AND PRODUCTION OF PROTEIN GELATINIZED PRODUCT USING SAID ENZYME

(57)Abstract:

PURPOSE: To produce a protein gelatinized product, by reacting a transglutaminase capable of catalyzing an acylation arrangement reaction of γ -carboxylamide group of a glutamine residue in peptide chain in the absence of Ca²⁺ with a protein.

CONSTITUTION: A protein-containing solution or slurry having $\geq 1.0\text{wt.\%}$ protein concentration is prepared. A transglutaminase capable of catalyzing an acyl arrangement reaction of γ -carboxylamide group of glutamine residue in a peptide chain in the absence of Ca²⁺ is added to the protein-containing solution or slurry and reacted with the protein to provide the protein gelatinized product. The above-mentioned transglutaminase is preferably added to the protein-containing solution or slurry at an amount of 0.01W2,000 unit based on 1.0g protein. Furthermore, the microorganism having transglutaminase producing ability includes bacterium belonging to the genus *Streptoverticillium*.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]



[Date of final disposal for application]
[Patent number]
[Date of registration]
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of extinction of right]

جَنَاحَةِ الْمُؤْمِنِينَ

⑨ 日本国特許庁 (JP) ⑩ 特許出願公開
 ⑪ 公開特許公報 (A) 昭64-27471

⑤Int.Cl. C 12 N 9/10 C 12 P 21/00	識別記号 7823-4B Z-6712-4B※	⑥内整理番号 Z-6712-4B※	⑦公開 昭和64年(1989)1月30日
審査請求 未請求 発明の数 2 (全16頁)			

⑧発明の名称 新規酵素及びそれを用いるタンパクゲル化物の製造法
 ⑨特 頼 昭62-165067
 ⑩出 頼 昭62(1987)7月1日
 ⑪優先権主張 ⑫昭62(1987)3月4日 ⑬日本(JP) ⑭特願 昭62-49157
 ⑮発明者 本木 正雄 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央
 研究所内
 ⑯発明者 沖山 敦 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央
 研究所内
 ⑰発明者 野中 雅彦 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央
 研究所内
 ⑱出願人 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号
 ⑲出願人 天野製薬株式会社 愛知県名古屋市中区錦1丁目2番7号

最終頁に続く

明細書

1. 発明の名称

新規酵素及びそれを用いるタンパクゲル化物の製造法

2. 特許請求の範囲

1. Ca^{2+} 非存在下でペプチド鎖内のグルタミン残基のアカルボキシアミド基のアシル転移反応を触媒する新規トランスクルタミナーゼ。
2. Ca^{2+} 非存在下でペプチド鎖内のグルタミン残基のアカルボキシアミド基のアシル転移反応を触媒する新規トランスクルタミナーゼの作用により、タンパク質濃度1.0重量%以上のタンパク含有溶液又はスラリーをゲル化させることを特徴とするタンパクゲル化物の製造法。
3. 新規トランスクルタミナーゼがタンパク含有溶液又はスラリー中のタンパク質1.0%に対して0.01~2000ユニット添加されることを特徴とする特許請求の範囲第2項記載の製造法。

3. 発明の詳細な説明

〔利用分野〕

本発明は新規なトランスクルタミナーゼ及びこれを用いるタンパクゲル化物の製造法に関する。

トランスクルタミナーゼは、ペプチド鎖内にあるグルタミン残基のアカルボキシアミド基のアシル転移反応を触媒する酵素である。

このトランスクルタミナーゼは、アシル受容体としてタンパク質中のリジン残基のε-アミノ基が作用すると、分子内及び分子間にε-(r-G1a)-Ly_n架橋結合が形成される。また水がアシル受容体として機能するときは、グルタミン残基が脱アミド化されグルタミン酸残基になる反応を進行させる酵素である。

また、この新規トランスクルタミナーゼを利用して製造される本発明のゲル化物は、従来のゲル状食品、ゲル状化粧料をはじめとしてヨーグルト、ゼリー、チーズ、ゲル状化粧料などとして用いられる。

更に、本発明に係るゲル化物は、未加熱で製造でき、熱に安定なゲルであるため、マイクロカプセルの素材、固定化酵素等の担体などとしても広

特開昭64-27471(2)

範囲に用いることができるものである。

〔従来技術〕

トランスクルタミナーゼはこれまで動物由来のものが知られている。例えばモルモットの肝臍 [Counsellian, et al., ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (Journal of Biological Chemistry) 246巻4号, 1093~1098頁 (1971)] 及び哺乳動物の臍器、血液に広く分布し [Folk et al., アドバンセス・イン・エンザイモロジー (Advances in Enzymology) 38巻, 109~191頁 (1973)], [Folk et al., アドバンセス・イン・プロテイン・ケミストリー (Advances in Protein Chemistry) 31巻, 1~133頁 (1977)]、その酵素の特徴も研究されている。

しかし、現時点では微生物由来のトランスクルタミナーゼについては報告されていない。また、動物由来のトランスクルタミナーゼを用いるタンパク質のゲル化物の製造法については本発明者等が既に研究を行なっている (特開昭58-149645)

能性はほとんど考えられなかった。

従って、本発明の課題は供給量、コストの面、精製の容易さ等のいずれの面からも問題ではなく、しかも反応に Ca^{2+} を必要としない点等、実用性の高い微生物由来の新規トランスクルタミナーゼ及び本酵素を作用させて得られるタンパクゲル化物の製造法の提供である。

〔問題点を解決するための手段〕

これまで動物由来の酵素が検討されてきたが实用性に欠けるため、本発明者等は資源を微生物に求め広く検索を行った結果、ストレプトペルチシリウム属の菌について Ca^{2+} 非存在下でペプチド鎖内のグルタミン残基の α -カルボキシアミド基のアシル転移反応を触媒する從来にない新規トランスクルタミナーゼ產生能があることが分かった。またこの酵素を用いることにより、タンパク質濃度 1.0 % 以上のタンパク含有溶液又はスラリーをゲル化させてタンパクゲル化物を製造できることを見い出し、本発明を完成するに至った。

ストレプトペルチシリウム属の菌を具体的に示

号)。

しかし、この動物由来のトランスクルタミナーゼの産業への利用、特にタンパク質のゲル化物の製造法には以下に述べるような欠点を有する。

動物由来のトランスクルタミナーゼは安価にまた大量に入手するのが困難である。また、ゲル化させるには、この高価な酵素が基質タンパク質 1 gあたり、1 ユニット以上必要でかつ、基質タンパク濃度が 2.0 豪量名以上必要であるという制限があること、更には、この動物由来のトランスクルタミナーゼはカルシウム (Ca^{2+}) 依存性である為に用途が制限される。

以上のような欠点を有する為に、動物由来のトランスクルタミナーゼを用いるゲル化物の製造についての実用化は困難であるのが現状である。

〔発明が解決しようとする問題点〕

従来トランスクルタミナーゼの供給は動物由来しているため実用性を考慮した場合、供給量、供給費用、保存費用、精製の困難さ等の種々の面から不利でありこのままで産業上の利用への可

能性はほとんど考えられなかった。

従って、本発明の課題は供給量、コストの面、精製の容易さ等のいずれの面からも問題ではなく、しかも反応に Ca^{2+} を必要としない点等、実用性の高い微生物由来の新規トランスクルタミナーゼ及び本酵素を作用させて得られるタンパクゲル化物の製造法の提供である。

これら微生物を培養し、トランスクルタミナーゼ (尚、以後 BTGase と記す) を取得するための培養法及び精製法等について述べる。本発明を実施するにあたり、その培養形態としては液体培養、固体培養いずれも可能であるが工業的には深部通気搅拌培養を行うのが有利である。又使用する培養源としては一般に微生物培養に用いられる炭素源、窒素源、無機塩及びその他の微量栄養源の他、ストレプトペルチシリウム属に適する微生物の利用出来る栄養源であれば全て使用出来る。培地の炭素源としてはアドク糖、シロ糖、ラスターーケン、グリセリン、デキストリン、澱粉等の他、脂肪酸、

特開昭64-27471(3)

油脂、有機酸などが単独で又は組合せて用いられる。酵素源としては無機酵素源、有機酵素源のいずれも使用可能であり無機酵素源としては硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、尿素、硝酸ソーダ、塩化アンモニウム等が挙げられる。又有機酵素源としては大豆、米、トウモロコシ、小麦などの粉、糖、脱脂粕をはじめコーンスティーブリカー、ペプトン、肉エキス、カゼイン、アミノ酸、酵母エキス等が挙げられる。無機塩及び微量栄養素としてはリン酸、マグネシウム、カリウム、鉄、カルシウム、亜鉛等の塩類のビタミン、非イオン界面活性剤、消泡剤等の菌の生育やBTGaseの生産を促進するものであれば必要に応じて使用出来る。培養は好気的条件で、培養温度は菌が発育しBTGaseが產生する範囲であれば良く、好ましくは25~35℃である。培養時間は条件により異なるがBTGaseが最も產生される時間まで培養すれば良く、通常2~4日程度である。BTGaseは液体培養では培養液中に溶解されており、培養終了後培養液より固体分を除いた培養液より採取される。

キサム酸の量を検量線より求め活性を算出する。BTGase活性は特に記載しないかぎり以下に記載する方法により測定した。

<活性測定法>

試薬A 0.2Mトリス塩酸緩衝液(pH 6.0)

0.1Mヒドロキシルアミン

0.01M還元型グルタチオン

0.03Mベンジルオキシカルボニル-L-グルタミルグリシン

試薬B 3N-塩酸

1.2%トリクロロ酢酸

5% FeCl₃·6H₂O (0.1N-HClIC溶解)

上記溶液の1:1:1の混合液を試薬Bとする。

酵素液の0.05mIC試薬A 0.5mlを加えて混合し37℃で10分間反応後、試薬Bを加えて反応停止とFe錯体の形成を行った後525nmの吸光度を測定する。対照としてあらかじめ熱失活させた酵素液を用いて同様に反応させたものの吸光度を測定し、酵素液との吸光度差を求める。別に酵

培養液よりBTGaseを精製するには通常酵素精製に用いられるあらゆる方法が使用出来る。

例えばエタノール、アセトン、イソプロピ^ルアルコール等の有機溶媒による処理、硫酸、食塩等による塩析、透析、膜外ろ過法、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、ゲルろ過、吸着剤、等電点分離等の方法が使用出来る。又これらの方針を適当に組合せる事によりBTGaseの精製度が上がる場合は適宜組合せて行う事が出来る。これらの方法によって得られる酵素は安定化剤として各種の塩類、糖類、蛋白質、脂質、界面活性剤等を加え或いは加えることなく、膜外ろ過段階、逆浸透段階、減圧乾燥、凍結乾燥、噴霧乾燥の方法により液状又は固形のBTGaseを得ることが出来る。

BTGaseの活性測定はベンジルオキシカルボニル-L-グルタミルグリシンとヒドロキシルアミンを基質としてCa²⁺非存在下で反応を行い、生成したヒドロキサム酸をトリクロロ酢酸存在下で鉄錯体を形成させ525nmの吸収を測定し、ヒドロ

キサム酸のかわりにL-グルタミン酸アノヒドロキサム酸を用いて検量線を作成し、前記吸光度差より生成されたヒドロキサム酸の量を求め、1分間に1μモルのヒドロキサム酸を生成する酵素活性を1単位とした。

このようにして得られる精製BTGase、即ちストレプトペルチシリウム・モバランス (Streptococcus moharaensis) IFO 13819 のトランスクルタミナーゼ (BTG-1と命名)、ストレプトペルチシリウム・クリセオカルネウム (Streptococcus griseescarneum) IFO 12776 のトランスクルタミナーゼ (BTG-2と命名)、ストレプトペルチシリウム・シナモネウム・サブ・エスピード・シナモネウム (Streptococcus cinnamoneum sub sp. cinnamoneum) IFO 12852 のトランスクルタミナーゼ (BTG-3と命名)についての酵素化学的性質について以下に記す。

a) 純度：

基質としてベンジルオキシカルボニル-L-グルタミルグリシンとヒドロキシルアミンを

特開昭64-27471(4)

使用した場合、37°C、10分反応でBTG-1の至適pHは6~7であり、BTG-2の至適pHは6~7付近にあり、BTG-3の至適pHは6~7付近にある(第1図、第5図、及び第9図に示される)。

b) 至適温度:

基質としてベンジルオキシカルボニル-L-グルタミルグリシンとヒドロキシルアミンを使用した場合、pH 6、10分反応でBTG-1の至適温度は55°C付近であり、BTG-2の至適温度は45°C付近であり、BTG-3の至適温度は45°C付近にある(第2図、第6図、及び第10図に示される)。

c) pH安定性:

37°C、10分間処理でBTG-1はpH 5~9で安定であり、BTG-2はpH 5~9で安定であり、BTG-3はpH 6~9で安定である(第3図、第7図、第11図に示される)。

d) 温度安定性:

pH 7で10分間処理ではBTG-1は40°Cでは88%活性が残存し、50°Cでは74%活性が

残存し、BTG-2は40°Cでは86%活性が残存し、50°Cでは56%活性が残存し、BTG-3は40°Cで80%活性が残存し50°Cでは53%活性が残存する(第4図、第8図、及び第12図に示される)。

e) 基質特異性:

各BTGaseを用い、各種合成基質とヒドロキシルアミンとの反応を調べた。いずれのBTGaseも合成基質がベンジルオキシカルボニルアスパラギニルグリシン、ベンジルオキシカルボニルグルタミルグリシン、グリシルグルタミルグリシンの場合反応しない。しかし合成基質がベンジルオキシカルボニルグルタミルグリシンの場合の反応性は最も高い。この時の各種合成基質濃度は5 mMとした。結果は表-1に示される。なお表-1中のCBZはベンジルオキシカルボニル基の略であり、Glnはグルタミル基の略であり、Glyはグリシル基の略であり、Aspはアスパラギニル基の略である。

表 - 1

基 質	BTG-1		
	%	%	%
CBZ-Gln-Gly	100	100	100
CBZ-Gln-Gly-o-Et	63	44	42
CBZ-Gln-Gln-Gly	38	39	35
CBZ-Gly-Gln-Gly-Gly	8	12	11
CBZ-Gly-Gly-Gln-Gly	23	58	60
CBZ-Gln	0	0	0
CBZ-Asp-Gly	0	0	0
Gly-Gln-Gly	0	0	0

表 - 2

金 屬 イ オ ン	BTG-1		
	%	%	%
None	100	100	100
CaCl ₂	101	102	102
BaCl ₂	101	99	105
CoCl ₂	103	103	103
CuCl ₂	79	82	86
FeCl ₃	96	104	106
KCl	96	99	105
MgCl ₂	102	104	103
NaCl	98	97	97
NaCl	99	102	101
NiCl ₂	102	100	101
Pb(CH ₃ COO) ₂	97	97	100
SrCl ₂	100	101	100
ZnCl ₂	15	24	24

f) 金属イオンの影響:

活性測定系に1 mM濃度になるように各種金属イオンを加えて影響を調べた(結果は表-2に示される)。いずれのBTGaseもCu²⁺, Zn²⁺により活性が阻害される。

特開昭64-27471(5)

a) 阻害剤の影響:

各阻害剤を 1 mM になるように加え、25℃、30分放置後、活性を測定した（結果は表-3 に示される。）。いずれの BTGase もペラクロロマーキュリー安息香酸（PCMB と略する）、N-エチルマレイミド（NEM と略する）、モノヨード酢酸により活性が阻害される。

表 - 3

阻 妨 剤	%		
	BTG-1	BTG-2	BTG-3
None	100	100	100
EDTA	102	98	99
PCMB	54	61	63
NEM	5	5	3
モノヨード酢酸	64	50	67
PMSF	104	95	101

表-3 中 PMSF はフェニルメチルスルホニルフルオライドの略である。

基質特異性に差が見られる。また Ca^{2+} の存在下及び非存在下においても本発明の BTGase は作用する点等でも明らかな差がみられる。従って本発明の各酵素は MTGase とはその性質を異にするものと考えられる。

表 - 4

	BTG-1	BTG-2	BTG-3	MTGase
至適 pH	6~7	6~7	6~7	6
pH 安定性	5~9	5~9	6~9	6~7.5
至適温度	55℃付近	45℃付近	45℃付近	50~55℃
温度安定性 (%)				
40℃ 残存率	88	86	80	96
50℃ 残存率	74	56	53	40
分子量	約 38,000	約 41,000	約 41,000	約 90,000
等電点	9.0	9.7	9.8	4.5
基質特異性(%)				
CBZ-Gly-Gly	100	100	100	100
CBZ-Gly-Gly-aEt	63	44	42	122
CBZ-Gly-Gly-Gly	38	39	35	288
CBZ-Gly-Gly-Gly-Gly	8	12	11	126
CBZ-Gly-Gly-Gly-Gly	23	58	60	27

b) 等電点:

アンボライン等電点電気泳動により求めたところ BTG-1 の等電点 pI は 9 付近であり、BTG-2 の等電点 pI は 9.7 付近であり、BTG-3 の等電点 pI は 9.8 付近である。

c) 分子量:

SDS アイスク電気泳動法により求めたところ BTG-1 の分子量は約 38,000 であり、BTG-2 の分子量は約 41,000 であり、BTG-3 の分子量は約 41,000 である。

トランスクルタミナーゼ

次に BTGase とモルモット肝由来の モルモットトランスクルタミナーゼ は特開昭58-149645号に記載された方法で調製した。表-4 には各酵素化学的性質の比較を、表-5 には Ca^{2+} の活性に及ぼす影響を示す。表-4 及び表-5 より明らかのように従来主として研究されているモルモット肝のトランスクルタミナーゼ（以後 MTGase と記す）と放線菌由来の BTGase とは酵素化学的性質において種々の差が見られ、特に温度安定性、分子量、等電点、

表 - 5

金属イオン	BTG-1	BTG-2	BTG-3	MTGase
None	99	98	100	0
1mM CaCl_2	100	100	99	39
5mM CaCl_2	100	100	98	100

次に BTGase を用いるタンパクゲル化物の製法について述べる。

まず、基質となるタンパク質は、リシン残基及びグルタミン残基を有し、上述の酵素の触媒をうけるものであれば、その起源、性状に制約されるものではなく、植物性タンパク質、動物性タンパク質、微生物タンパク質、藻類タンパク質などいかなるものでも使用できる。植物性タンパク質としては特にその種類は限定しないが、例えば油糧穀物の脱脂物及びそれらより分離したタンパク質などを挙げることができる。また動物性タンパク質としては、特にその種類は限定しないが、たとえば乳タンパク、ゼラチン、コラーゲン、血清アル

特開昭64-27471(6)

アミン等を例示することができる。

また本発明に用いる蛋白質としては前記以外にもアロテアーゼなどで部分的に切断したタンパク質、合成ペプチドおよび各種の化学修飾したタンパク質でも、グルタミン残基、リジン残基を有する条件が満たされれば、この酵素の基質となることができる。

これらのタンパク質の1重量%以上、好ましくは3重量%以上の液体又はスラリーであれば、

BTGase の添加により高粘性物、あるいはゲル状物が形成され、1重量%以下であれば、溶液状又は沈殿状の架橋高分子化物が得られる。BTGase はタンパク1gに対して0.01~2000 Unit 添加、好ましくは0.1~200 Unit 以上添加、反応溶液のpHは4~10、好ましくは5~8に調整し、5~80℃、好ましくは40~60℃で10秒~24時間、好ましくは10分~2時間インキュベートすると架橋高分子化物ないしはゲル状物を得ることができる。このように、本発明の BTGase は低い酵素濃度でゲル化できる(基質タンパク質1gあたり

0.01ユニット以上あればよい)、及び低い基質濃度で使用できる(基質タンパク質濃度1重量%以上あればよい)等の特徴を有する新規な酵素である。

この BTGase 处理により十分なゲル化物が得られるが、更に必要により反応終了後のゲル化物を60~200℃で1分間~24時間加熱処理することにより更に強固なゲル化物が得られる。このタンパク含有溶液は単にタンパクと水との混合物に限らず、タンパク、水および油脂を混合した水中油型又は油中水型エマルジョンであってもよく、各種塩類、澱粉、少糖類、多糖類、香料、保湿剤、着色料なども BTGase による架橋高分子化及びゲル化と阻害しない範囲で適宜選択して添加することができる。

またタンパク質の種類と量を調整することによって架橋高分子化物の架橋度を変えることができ、これにより、生成するゲルの物性及び含水量を目的と用途に応じて変えることができる。

以下に本発明の実施例について述べる。

実施例 1

ストレプトベルテシリウム・モバラエンス (*Streptoverticillium moharranense*) IFO 13819 を培地組成ポリペプトン0.2%、グルコース0.5%、リン酸二カリウム0.2%、硫酸マグネシウム0.1%からなる培地(pH 7)200mlに接種し30℃、48時間培養し、得られた培養液をポリペプトン2.0%、ラスターーゲン2.0%、リン酸二カリウム0.2%、硫酸マグネシウム0.1%、酵母エキス0.2%、消泡剤としてアデカノール(商品名、旭電化社製品)0.05%からなる培地20ml(pH 7)に加え30℃で3日間培養後ろ過し培養液18.5mlを得た。このものの活性は0.35u/mlである。

培養液を塩酸でpH 6.5に調整し、予め0.05Mリン酸緩衝液(pH 6.5)で平衡化しておいたCG-50(商品名、オルガノ社製品)のカラムに通した。この操作でトランスクルタミナーゼは吸着された。さらに同緩衝液で不純蛋白質を洗い流した後、さらに0.05~0.5Mの同緩衝液の濃度勾

配をつくり、通液して溶出液を分画回収し、比活性の高い分画を集めた。電導度を10ms以下になるように希釈後ブルーセファロースのカラムに通した。この操作でトランスクルタミナーゼは吸着された。更に0.05Mリン酸緩衝液(pH 7)で不純蛋白質を洗い流した後、0~1Mの食塩濃度勾配をつくり通液して溶出液を回収し比活性の高い画分を集めた。UF 6000膜を使い濃縮し、0.5Mの食塩を含む0.05Mリン酸緩衝液(pH 7)で緩衝液を用いて平衡化させた。

得られた濃縮液を同緩衝液で予め平衡化しておいたセファデックスG-75(ファルマシアファインケミカル社製)を含むカラムに通し、同緩衝液を流して溶出液を分画した。この結果活性画分は单一のピークとして溶出された。このものの比活性は培養液に対し625倍であり、回収率は47%であった。

実施例 2

実施例1と同様にしてストレプトベルテシリウム・グリセオカルネウム(*Streptoverticillium*

特開昭64-27471(7)

erlascarnum) IFO 12776 を 30℃ で 3 日間培養後ろ過し培養液 1.9 ℥を得た。このものの活性は 0.28 U/mg であった。

実施例 1 と同様な方法で酵素を精製して SDS ティスク電気泳動で单一の酵素を得た。

実施例 3

実施例 1 と同様にしてストレプトペルチシリウム・シナモネウム・サブ・エスピード・シナモネウム (*Streptoverticillium cinnamomeum* sub sp. *cinnamomeum*) IFO 12852 を 30℃ で 3 日培養後ろ過し培養液 1.85 ℥を得た。このものの酵素活性は 0.5 U/mg であった。

実施例 1 と同様な方法で酵素を精製して SDS ティスク電気泳動で单一の酵素を得た。

実施例 4

(1) 特開昭58-149645号の実施例 1 に記載された方法により調製または購入した食品タンパク類、すなわち①α_{s1}-カゼイン、②Na-カゼイノート③大豆 11S グロブリン④大豆 7S グロブリン⑤分離状大豆タンパク「アグロロン S-2」(味

度は 1.5 % であった。これに実施例 4 と同様の条件で BTGase を添加しゲル化能を調べた。結果は表 6 に示した。

(3) BTGase の基質とするためエビミオシンを次のように調製した。

新鮮(生)甘えび(体長約 5 cm)の皮をむきエビ屈曲筋肉を取り出し、ミンチ後、氷水洗浄し、更に冷却下 0.1 mM DTT, 0.1 mM PMSF 存在下でホモジナイズし、遠心分離でアクトミオシンを抽出分離した。更に 10⁵ × g で 60 分間超遠心操作によりアクチンを除きミオシンに富んだ両分を得た。更に希朮沈殿/超遠心操作を繰り返し、エビ精製ミオシンを得た。この精製ミオシンは Ca-ATPase 活性がなくアクトininとの結合記も消失していることから、変性ミオシンであることがわかった。このタンパク濃度 3.6 % の変性エビミオシン溶液 5 mL (緩衝液、0.5 M KCl, 5 mM CaCl₂, 2.5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM DTT) に対し 3.6 μmol の BTGase を添加し、35℃ の水浴中に浸漬することによって反応を開始し、最大 35 分間反応さ

の素調)⑥水抽出大豆タンパク⑦酸沈澱大豆タンパク⑧大豆タンパク粒子⑨大豆タンパクミセル⑩セラチンの各 5, 10 重量パーセントの溶液または疊層液 5 mL に、実施例 1 で調製した BTGase (凍結乾燥品 比活性 2.50 Unit/mg protein) をタンパク 1 mg 当り 0.02 U 加え、35℃、1 時間振盪~~後~~インキュベートした。室温放置後、サンプルの入った試験管を倒置し、流れ落ちるか、どうかでゲル化を判定した。結果は表 6 に示した。

(2) BTGase の基質とするためウサギミオシンを次のように調整した。

Perry の方法 (Perry, S. V. (1955), "Methods in Enzymology" vol 2 pp 582-588, Academic Press, New York) に従い、ウサギの骨格筋 25 g より 3 倍量の 0.45 M KCl, 5 mM ATP-MgCl₂, 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.4) 中で 0℃、30 分間ミオシンを抽出し、以下希朮沈殿によって集め 0.5 M KCl, 2.0 mM Tris-maleate (pH 7.5) 液に透析し、10⁵ × g で 60 分間遠心分離した上清を精製ミオシンとして使用した。タンパク濃

せた。

以上のゲル化能の実験結果をまとめると表 6 のようになった。

尚、比較例として、MTGase によるゲル化能試験結果も示した。尚、MTGase の添加量は基質たんぱく質 1 mg 当り 0.1 U とした。

特開昭64-27471(8)

表 6 各種タンパク質のBTGaseによるゲル化(試験管例置法)

食品タンパク質	濃度(%)	BTGase	MTGase
α_{s1} -カゼイン	5 10	○ ○	○ ○
Na-ガゼインネット	5 10	○ ○	△ ○
大豆11Sグロブリン	5 10	○ ○	△ ○
大豆7Sグロブリン	5 10	○ ○	×
アグロプロンB-2	5 10	○ ○	×
水抽出大豆タンパク	5 10	○ ○	×
強化濃大豆タンパク	5 10	○ ○	×
大豆タンパク粒子	5 10	○ ○	×
大豆タンパクミセル	5 10	△ ○	×
セラテン	5 10	○ ○	×
ウサギミオシン	1.5	○	○
エビミオシン	3.6	○	○

(注) ○: ゲル化
 △: 硬いゲル
 ×: 液状のまま
 MTGaseは37°C、1時間反応させた。

9.3M 奥化リチウム(LiBr)溶液1.00mLに加え、40°Cで一晩攪拌すると精米は可溶化した。この溶液に対し吸引汎過、対水透析を行い粗精蛋白質水溶液(約2重量%)を得た。予め試験管内に最終濃度が0.01U, 0.02U, 0.04U/mg proteinとなるように実施例4と同じBTGaseを入れておき、シェアリングによるゲル化をさけるために静かに精蛋白質水溶液を加えた。対照としてBTGase未添加のものも用意した。各々の試験管を室温で一晩放置後試験管内の試料の状態を観察し表8の結果を得た。

表 8

試 料	状 因
精蛋白質水溶液-BTG	×
/ + BTG (0.01U/mgタンパク質)	○
/ + " (0.02U/mgタンパク質)	○
/ + " (0.04U/mgタンパク質)	○

(注)
 ×: 試験管倒置により落下。透明溶液状
 ○: " しても落下せず。白濁ゲル状

実施例5

セラテン[新田ゼラテン製]に5.10重量ペーセント溶液となるように0.1Mトリス-HCl buffer(pH 7.6)を加え、60°C、3分で完全にセラテンを溶解し実施例4と同じBTGaseを0.02U/mg proteinを加えよく搅拌後37°C、1時間反応させた後、沸とう水浴中に10分間加熱した直後の状態を観察した。

尚、BTGaseを添加しない以外は全く同一の処理をしたものと対照とした。結果は表-7に示した。

表 - 7

	- BTG	+ BTG
5% ゼラテン	×	○
10% ゼラテン	×	○

(注) ×: 完全な溶液
 ○: ゲル状態(加熱しても溶解しない)

実施例6

BTGaseの基質とするため、精蛋白質水溶液を以下の方法で調製した。脱脂豆みの精糸2.33gを

実施例7

市販牛乳(粗タンパク2.9%)を約5倍(粗タンパク14.5%)に減圧濃縮して得た濃縮牛乳1Lに対して、実施例4に示したBTGaseを2ユニットを加えて搅拌し、55°C、30分インキュベートした。生じたゲル状物を80~95°C、20分加熱し残存酵素を失活させた後、冷却するとプリン状のゲル食品を得た。要すれば、10%程度まで砂糖を添加しても同様のゲル状物を得ることができた。

実施例8

市販牛乳(粗タンパク2.9%, 油脂3.2%, 水分8.9%)を約5倍に減圧濃縮し、濃縮牛乳(約10g)とし、これに30gのグルコノデルタラクトン溶液1.00mLを加え、速やかに混合した後、pH 6.0以上であることを確認してから、実施例4に示したBTGase 1.00ユニット加えて、搅拌し、45°C、45分間インキュベーター中に静置させゲル化させた。かかる後にゲルを離わさないようにゲルを80~95°C迄加熱し、BTGaseの失活と

特開昭64-27471(9)

グルコノアルタクトンのグルコン酸への分解を行ない、ゲルの凹を4~5に調整させた。そして冷却後、カーボン酸のゲルを約8cm角にカッティングし、酸塩法で2%程度の塩濃度にして *Pediococcus acidilactici* (ペニシリウム・カゼイコラム) のスターを接種し、15℃、3週間、RH 85%で熟成させ、チーズを得た。

尚、グルコノアルタクトンを用いない場合は、乳酸菌 (*Lactobacillus acidophilus*, ラクトバチルス・アシドフィラス) を添加し、BTGase_e でゲル化後、40℃で2~5 hr 発酵させても同じようなチーズが得られた。

本法で得られるチーズは、高価な子牛のレンネットを使用せずに製造することができ、またその物性は、かなりしなやかな弾性をもつ品質の良いものであった。

実施例 9

実施例 8 の濃縮乳 (1kg) を5℃前後に冷却して、*Streptococcus thermophilus* (ストレプトコッカス・サーモフィラス) からなるスター

(5%程度) をすばやく添加混合し、更に実施例4と同様の BTGase_e 1ユニット加えて攪拌し、35℃、1 hr インキュベーターの中で静置ゲル化させた。次にゲル温度を50℃、40分間加温し、*S. thermophilus* によって酸を生成せしめかつフレーバーを増加せしめた後、更に75~85℃に加温せしめ BTGase_e を失活させた。冷却すると軽い酸味を持つ品質の優れたヨーグルト様食品が得られた。

実施例 10

市販豆乳 (明治乳業製、サングロー豆乳、粗タンパク 3.1%) を約2.5倍に減圧濃縮し、更に20℃以下に冷却して得られた濃縮豆乳 (粗タンパク 7.75%) 1kgに対し、実施例4に示した BTGase_e を4ユニット加えてプラスチック容器に充填し、フタをヒールした後、55℃の湯浴中で30分加温し、酵素反応させゲル化した。しかる後に高周波誘電加熱装置 (電子レンジ、2450メガヘルツ、波長1.2cm) を用いて加熱した。通常の綿ごし豆腐、木綿豆腐と比較するとしなやかで、

重くずれしない品質の良い豆腐様ゲルができた。

実施例 11

九大豆 6.5 kg を20kg位の水に満たし、常温で1晩充分吸水膨潤させたものを、水を加えながら磨碎機ですりつぶし「ご」を得た。これに更に水を2.5kg加え、ごを薄め少量の消泡剤を添加し煮込み移し、スチームを吹き込んで加熱した。加熱条件は5分かけて100℃まで上げ、3~5分保つ方法がよい。煮込み後おから絞り機でおからを除き濃厚豆乳 (粗タンパク 7.0%，油分 8.1%，水分 7.5%) 3.0kg 得た。これに実施例4に示した BTGase_e を200ユニット加えて直ちにケーシングチューブ (塩化ビニリデンチューブ) に充填し、37℃、30分湯浴中に加熱した。次に90℃以上湯浴中に移し、加熱 (30~60分) し、流水にて豆腐様ゲルを得た。

実施例 12

表9のレシピでカマボコを試作し、レオメーター (不動工業(株)製) による物性測定と官能評価 (n=10) を実施した。なお BTGase_e の添加量

はすり身乾物 1kg に対して 20 Unit であり、酵素反応は BTGase_e 無添加のコントロールのすわり工程と同様に 34℃、2時間とし、反応終了後 85℃、30分間加熱して製品とした。

表 9

	コントロール (%)	BTGase _e 添加 (%)
すり身 C級	6.6.9	6.6.9
馬鈴薯澱粉	6.7	6.7
みりん	2.0	2.0
砂糖	2.0	2.0
食塩	1.7	1.7
MSG	0.7	0.7
水	20.0	19.3
BTGase _e	0	0.2

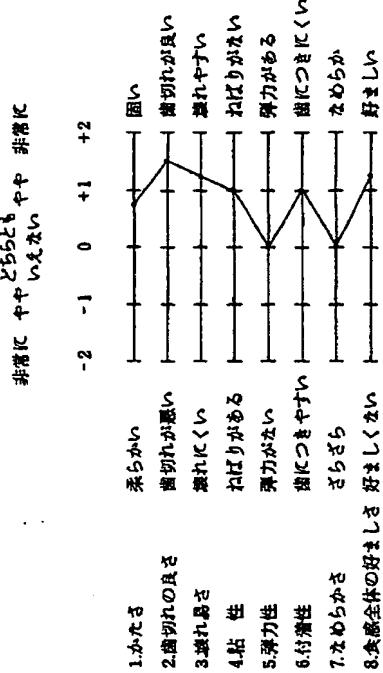
物性測定および官能評価の結果を表10、11に示す。

特開昭64-27471(10)

表 10

	破断強度 (kg)	延 (%)
コントロール (BTGase 無添加)	454 ± 5.0	44.3 ± 2.3
BTGase	804 ± 5.8	46.3 ± 1.3

表 11 テクスチャープロファイル



(コントロールの評点を0とした時)

表 12

	コントロール (%)	BTGase 添加 (%)
豚スネ肉	68.4	68.4
食 塩	1.5	1.5
亜硝酸ナトリウム	0.02	0.02
アスコルビン酸Na	0.06	0.06
砂 糖	2.1	2.1
MSG	0.4	0.4
ホワイトペッパー	0.3	0.3
水	27.22	27.20
BTGase	—	0.02

物性測定および官能評価の結果を表 13 及び表 14 に示す。

表 13

	弾性率 ($\times 10^5 \text{dyn} \cdot \text{cm}^{-2}$)	粘性率 ($\times 10^9 \text{dyn} \cdot \text{sec} \cdot \text{cm}^{-2}$)
コントロール	4.73	1.48
BTGase 添加	5.83	1.92

(12)

II

特開昭64-27471 (11)

以上のように BTGase を添加して試作したソーセージは BTGase のゲル形成能によりコントロールに比べて粘弾性に富んだ食感がたえの好ましい食感となることがわかった。

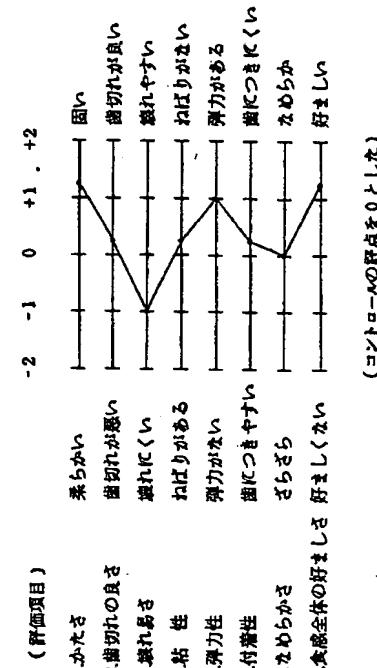
実施例 14

表 15 のレシピでホイッピング・クリームを試作し、絞り出し特性を評価した。なお、BTGase の添加量はカゼイン・ナトリウム乾物 1 g に対して 1 Unit であり、ホイップ操作は万能混合攪拌機（三栄製作所（株）製）を用い、7~9°C で実施した。尚、BTGase 無添加のものをコントロールとした。

表 15

	コントロール (%)	BTGase 添加 (%)
ヤシ油	25.0	25.0
カゼインナトリウム	5.0	5.0
モノグリセリド	0.3	0.3
水	69.7	69.7
BTGase	—	0.005

表 14 テクスチャープロファイル



(コントロールの評点を0とした)

それぞれのホイッピング・クリームを用いてガラス板上に花柄を描いて状態を観察したところ、BTGase を添加したホイッピング・クリームでは画線の鋭い造花が可能となった。

実施例 15

表 16 のレシピでアイスクリームを試作し室温に置いた時の形態変化を観察し、メルトダウン耐性を評価した。なお、BTGase の添加量は脱脂粉乳乾物 1 g に対して 25 Unit であり、酵素反応はアイスクリームミックスの殺菌工程（68°C, 30 分間）で実施した。殺菌後、5°C で一晩エーディングさせたアイスクリームミックスをアイスフリーザー（三栄重工（株）製）を用い、品温-2~4°C でオーバーラン 90 分までフリーゾングを行い、コンに充填後、-40°C で硬化させ製品とした。尚、BTGase を添加しない以外は全く同様の操作を行って試作したアイスクリームをコントロールとした。

表 16

	コントロール (%)	BTGase 添加 (%)
ヤシ油	5.0	5.0
脱脂粉乳	8.0	8.0
砂糖	13.0	13.0
水	6.0	6.0
グリコール	0.1	0.1
カラギーナン	0.1	0.1
ローカストビーンガム	0.1	0.1
モノグリセライド	0.3	0.3
ベニラエッセンス	0.1	0.1
水	67.3	67.1
BTGase	—	0.2

コントロールは室温静置後 15 分で形崩れしてしまったが、BTGase を添加したアイスクリームは 30 分以上も形崩れを起こさず、しかもコントロールと同様、滑らかな口ざわりをしていた。

実施例 16

試験管内に所要量の牛皮由来アレコラーゲン

特開昭64-27471(12)

粉末(高研(株)製)をとり、0.1M Tris-HCl バッファー($\text{pH } 7.5$)2mlを加え、55℃の水浴中に15分間保持した後攪拌することにより3~10%アテロコラーゲン溶液を調製した。高濃度溶液が冷却によるゲル化をおこさないうちにBTGaseを0.05U/mlタンパク質となるよう添加し、55℃で60分間インキュベートした。全量のコントロールとしてBTGaseを添加しない10%アテロコラーゲン溶液についても同様にインキュベートした。インキュベート終了直後、室温で60分放置後、更にその後100℃の水浴中に15分保持後に試験管内の様子を観察した。その結果を表17に示した。

表 17

	インキュベート終了直後	60分放置後	100℃で加熱後
3%溶液+BTGase	○	○	○
5%溶液+BTGase	○	○	○
10%溶液+BTGase	○	○	○
10%溶液-BTGase	×	○	×

(注) ○:ゲル化している
×:ゲル化していない

実施例17

生オキアミ凍結肉(大洋漁業製)1kgをフローメンカッターにより細碎し、これに食塩30g、ソルビトール(味の素製)100g、新ねり味(味の素製)50g、みりん40g、馬レイン・澱粉50gを加えさらに2000ユニットのBTGaseを300mlの冷水に可溶化後加えて、ステファン製カッターにて約6分混練した。混練直後の温度は5~6℃に制御した。このオキアミ肉ペーストを塩化ビニリデン製のケーシングチューブ(クリ

ヘ化学製)に充填し、50℃にて、1時間インキュベート後、沸とう湯浴中で25時間加熱した。加熱後流水にて冷却した後、物性測定をした。即ちサンプルを厚さ3mmに切断し、直径7mmの球形プランジャーを使用して、不動工業製レオメーターにて測定を行ない、破断強度を求めた。その結果を表18に示した。尚、コントロールは、BTGaseを予め、高温加熱変性して失活せしめたものを用い、同様の方法で調製した。

表 18

	破断強度(g/cm²)
コントロール	286
BTGase 添加区	442

すなわち、BTGaseをえたオキアミ肉のかまぼこ試作品はBTGaseを予め失活したコントロール区よりも格段に高い破断強度を示すことが認められた。

実施例18

表19のレシピでうどんを作り、官能評価($n=15$)と物性測定を実施した。

表 19

	コントロール	BTGase 添加
(%)	(%)	
強力粉	36.4	36.4
薄力粉	36.4	36.4
食塩	0.5	0.5
水	26.7	26.7
BTG	—	0.04

BTGaseの添加量は蛋白質1g当たり1Uとし、室温で2時間酵素反応を行なった後、製造した。官能評価および物性測定は12分間ゆでたうどんで行なった。物性測定に用いた紐の長さは7mm、レオメーター(不動工業製)を用いて引張り試験を行ない破断強度と破断するまでの伸びを測定した。結果を表20、表21に示した。

(14)

-13-

特開昭64-27471(13)

表 21

	破断強度 (g)	伸び (mm)
コントロール	706±23	64±5
BTG	885±48**	51±13

n = 10 ** 危険率1%で有意差あり

官能評価、物性測定の結果はよく一致しており、
BTG_{base}を添加することにより、グルテン分子の間に
果橋構造が生成し、シコシコした歯詰うどんに
近い食感の麺が出来ることが明らかになった。

実施例 1 9

表22のレシピでスペゲティを作り、官能評
価(n=15)と物性測定を実施した。

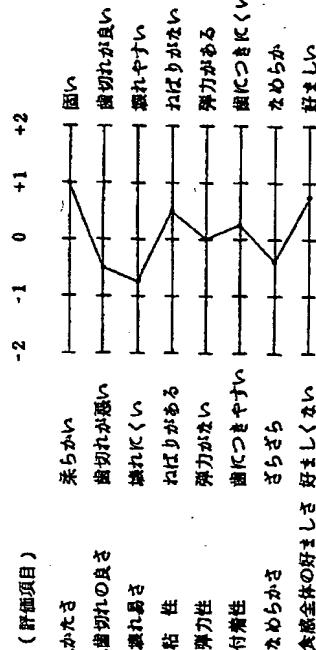
表 22

	コントロール (%)	BTG _{base} 添加 (%)
強力粉	73.7	73.7
食 塩	0.6	0.6
水	25.7	25.7
BTG	—	0.04

表 20 テクスチャープロファイル

(コントロールを0とした時のBTG_{base} 添加サンプルの評点)

非常に やや どちらとも やや 非常に

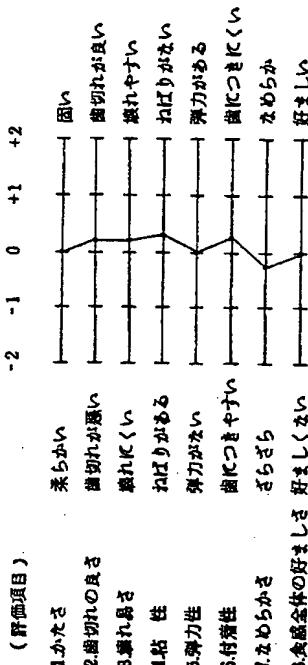


BTG_{base} の添加量は蛋白質 1 g 当たり 1 U とし、
室温で 2 時間酵素反応を行なった後、パスタマシン
(ラッキーコーヒーメーカー製)で調理した。
官能評価および物性測定は 5 分 30 秒ゆでた麺で
行なった。物性測定に用いた麺の長さは 7 cm、レ
オメーター(不動工業製)を用いて引張り試験を行
ない、破断強度と破断するまでの伸びを測定し
た。結果を表23、表24に示した。

表 23 テクスチャープロファイル

(コントロールを0とした時のBTG_{base} 添加サンプルの評点)

非常に やや どちらとも やや 非常に



特開昭64-27471 (14)

表 24

	破断強度 (kg)	伸び (mm)
コントロール	29±2	77±7
BTG (1U/g)	27±1	54±9**

n = 10 ** 危険率1%で有意差あり

BTGase をスペゲティに作用させても表23のように食感に大きな変化は生じなかったが、製造工程でミキシングした粉がサラサラしており、スクリューへのフィーディングがスムーズでシリンダ内での発熱が少ないなど作業性が大幅に改善された。

〔発明の効果〕

本発明の微生物由来の BTGase は安価に供給され、かつ精製も容易であるので実用性が大である。

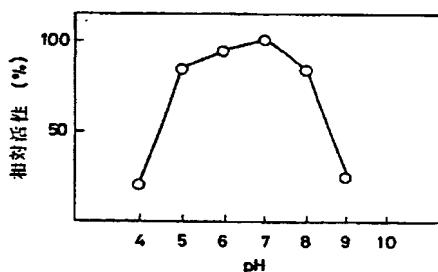
また、BTGase を用いることにより、カルシウム非存在下で又カルシウム存在下でも酵素(BTGase)濃度及び基質濃度が非常に低いところで品質の優れたゲル化物を製造できるという利点がある。

4. 図面の簡単な説明

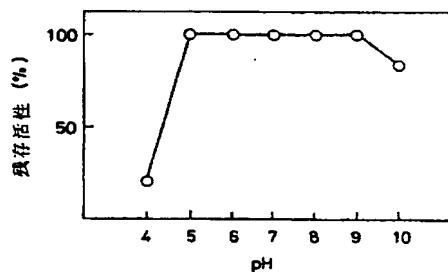
第1図、第2図、第3図及び第4図は本願発明の BTG-1 の至適pH曲線、至適温度曲線、pH安定曲線及び温度安定曲線を示すものであり、第5図、第6図、第7図及び第8図は本願発明の BTG-2 の至適pH曲線、至適温度曲線、pH安定曲線及び温度安定曲線を示すものであり、第9図、第10図、第11図及び第12図は、本願発明の BTG-3 の至適pH曲線、至適温度曲線、pH安定曲線及び温度安定曲線を示すものである。

特許出願人　味の素株式会社
天野製薬株式会社

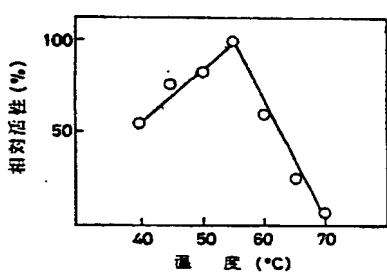
第1図



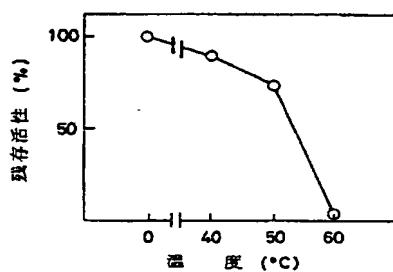
第3図



第2図



第4図

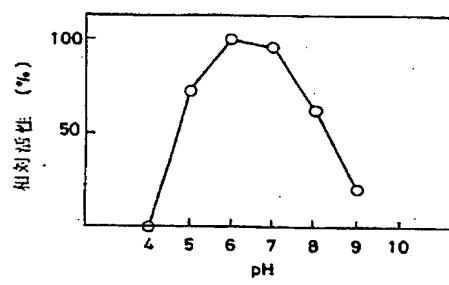


(16)

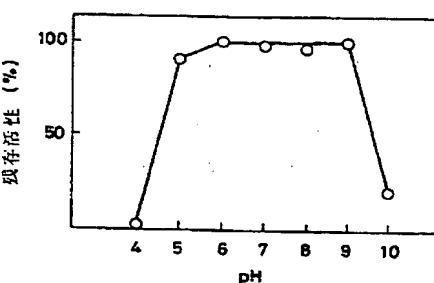
— 15 —

特開昭64-27471(15)

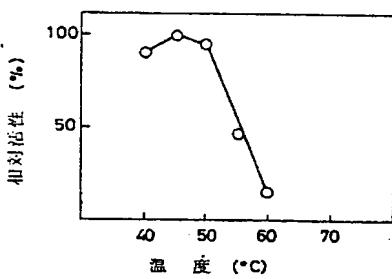
第5図



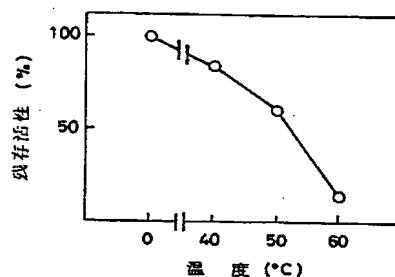
第7図



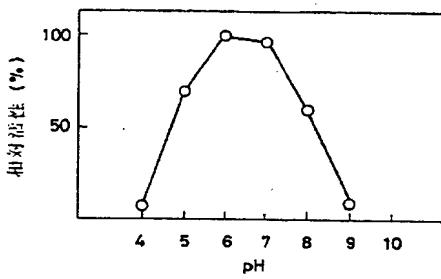
第6図



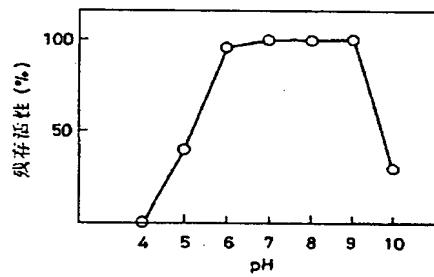
第8図



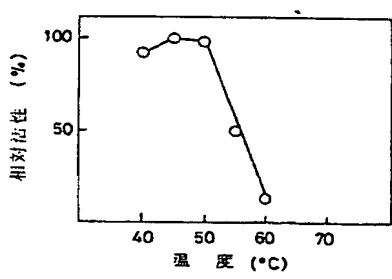
第9図



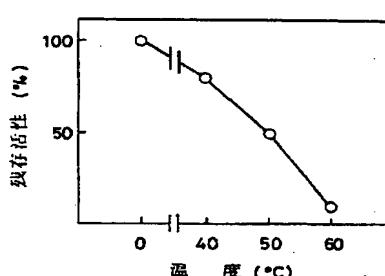
第11図



第10図



第12図



特開昭64-27471 (16)

第1頁の続き

⑤Int.Cl. ⁴	識別記号	序内整理番号
// A 23 C 19/032		8114-4B
A 23 J 3/00		X-7236-4B
A 23 L 1/03		7235-4B
	1/04	8114-4B
(C 12 N 9/10		
C 12 R 1:01)		

⑥発明者 田中 晴生	神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央 研究所内
⑦発明者 内尾 良輔	東京都中央区京橋1-5-8 味の素株式会社内
⑧発明者 松浦 明	愛知県春日井市松本町539-2
⑨発明者 安藤 裕康	愛知県江南市古知野町千丸221
⑩発明者 梅田 幸一	岐阜県羽島郡笠松町北及字北山1984-25